

Poly-3-hydroxy butyric acid recovery from bacteria - by solvent extraction, esp. after spray drying, useful as plastics material

Patent Assignee: IMPERIAL CHEM IND LTD

Inventors: ALDERSON B; HOLES M P A; SENIOR P J; WRIGHT L F

Patent Family (8 patents, 11 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 15123	A	19800903	EP 1981200352	A	19790829	198037	B
			EP 1980300431	A	19800214		
DK 198000733	A	19800922				198042	E
JP 55118394	A	19800911				198043	E
ZA 198000803	A	19810506				198130	E
US 4324907	A	19820413	US 1980125483	A	19800222	198217	E
EP 15123	B	19821222	EP 1980300431	A	19800214	198301	E
DE 3061384	G	19830127				198305	E
DE 3061823	G	19830310				198311	E

Priority Application Number (Number Kind Date): EP 1980300431 A 19800214; GB 197915859 A 19790508; GB 19796077 A 19790221; GB 19796076 A 19790221; GB 197915858 A 19790508

Patent Details

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
EP 15123	A	EN			
Regional Designated States, Original					BE CH DE FR GB IT LU NL
ZA 198000803	A	EN			
EP 15123	B	EN			

Regional Designated States, Original	BE CH DE FR GB IT LU NL
--	-------------------------

Alerting Abstract: EP A

Poly-3-hydroxy--butyric acid (I) is recovered from an aq. suspension of bacterial cells by spaying the suspension into a gas stream at ≥ 100 degrees (100-500) degrees C to evaporate the water, then solvent extracting (I) from the dried cells.

Pref. the cells are first washed to removed lipids and/or pigment, using a solvent (esp. acetone or methanol) which will not dissolve (I). The extraction solvents are esp. 1,2-dichloroethane (II), CH₂Cl₂ and CHCl₃, and extraction is at >40 degrees C using 10-100 wt. times solvent on dry wt. of cells.

In a modification (II) can be used to extract (I) directly from cell suspensions, opt. after rupturing the cells, at 10-40 degrees C with the pH of the (ruptured) cell suspension adjusted to within 0.5 units of the isoelectric point.

(I) can be used as a plastics material, e.g. the extracted solns. can be used directly for solvent-casting coatings, films or fibres. The cell residues after extraction can be used as feed or fertilizer. The spray-drying stage weakens the cells so that a separate milling stage is not required.

International Classification (Main): C07C-067/56 **(Additional/Secondary):** C07C-069/67, C07C-069/675, C08G-063/72, C12P-007/62

US Classification, Issued: 560185000, 210639000, 528361000

Germany

Publication Number: DE 3061384 G (Update 198305 E)

Publication Date: 19830127

Language: DE

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508|DE 3061823 G (Update 198311 E)

Publication Date: 19830310

Language: DE

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Denmark

Publication Number: DK 198000733 A (Update 198042 E)

Publication Date: 19800922

Language: DA

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB

197915859 A 19790508

European Patent Office

Publication Number: EP 15123 A (Update 198037 B)

Publication Date: 19800903

Verfahren zur Extraktion von Poly-(3-Hydroxybuttersaeure) aus mikrobiellen Zellen A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells Procede pour l'extraction de l'acide poly-(3-hydroxybutyrique) a partir de cellules microbiennes

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB (ICIL)

Inventor: HOLES M P A Wright, Leonard Frederick, 8, Blairmore Gardens Eaglescliffe, Stockton-on-Tees Cleveland, GB Alderson, Barry, 5 Sinderby Close, Billingham Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries Limited Legal Department: Patents Thames House North Millbank, London SW1P 4QG, GB

Language: EN

Application: EP 1981200352 A 19790829 EP 1980300431 A 19800214 (Local application)

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LU NL

Original IPC: C07C-67/56 C07C-69/67 C08G-63/72 C12P-7/62

Current IPC: C07C-67/56 C07C-69/67 C08G-63/72 C12P-7/62

Original Abstract: A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells. Poly-3-hydroxybutyric acid is separated from bacterial cells by drying a finely divided stream or spray of an aqueous suspension of the cells with a gas heated to above 100(deg)C and then extracting the PHB, preferably after a lipid extraction step with a solvent such as methanol or acetone, with a PHB-solvent such as a partially halogenated hydrocarbon such as 1,2-dichloroethane, chloroform or dichloromethane. 1,2-Dichloroethane may also be used to extract PHB directly from an aqueous cell suspension without an intermediate drying step. In this case, for some bacteria, the suspension is preferably subjected to a cell disruption step, eg milling, prior to contact with the 1,2-dichloroethane. |EP 15123 B (Update 198301 E)

Publication Date: 19821222

Verfahren zur Extraktion von Poly-(3-Hydroxybuttersaeure) aus mikrobiellen Zellen A process for the extraction of poly-3-hydroxy-butyric acid from microbial cells Procede pour l'extraction de l'acide poly-(3-hydroxybutyrique) a partir de cellules microbiennes

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB

Inventor: Holmes, Paul Arthur, 27 Alprahan Crescent, Upton by Chester Cheshire, GB Wright, Leonard Frederick, 8, Blairmore Gardens Eaglescliffe, Stockton-on-Tees Cleveland, GB Alderson, Barry, 5 Sinderby Close, Billingham Cleveland, GB Senior, Peter James, Foulis Cottage Ingleby Greenhow, Middlesbrough Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries PLC Legal Department: Patents Thames House North Millbank, London SW1P 4QG, GB

Language: EN

Application: EP 1980300431 A 19800214 (Local application)

Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LU NL

Original IPC: C12P-7/62 C08G-63/72

Current IPC: C12P-7/62(A) C08G-63/72

Japan

Publication Number: JP 55118394 A (Update 198043 E)

Publication Date: 19800911

Language: JA

Priority: GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508

United States

Publication Number: US 4324907 A (Update 198217 E)

Publication Date: 19820413

****Extraction process****

Assignee: Imperial Chemical Industries Limited

Inventor: Senior, Peter J., GB Wright, Leonard F. Alderson, Barry

Agent: Cushman, Darby Cushman

Language: EN

Application: US 1980125483 A 19800222 (Local application)

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Original IPC: C07C-67/56 C07C-69/675

Current IPC: C07C-67/56(A) C07C-69/675

Original US Class (main): 560185

Original US Class (secondary): 210639 528361

Original Abstract: Poly(beta-hydroxybutyric acid) is separated from bacterial cells by drying a finely divided stream or spray of an aqueous suspension of the cells with a gas heated to above 100(deg) C. and then extracting the PHB, preferably after a lipid extraction step with a solvent such as a partially halogenated hydrocarbon such as 1,2-dichloroethane, chloroform or dichlorom

South Africa

Publication Number: ZA 198000803 A (Update 198130 E)

Publication Date: 19810506

Language: EN

Priority: GB 19796076 A 19790221 GB 19796077 A 19790221 GB 197915858 A 19790508 GB 197915859 A 19790508

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 1958084

EXTRACTION OF POLY(33-OXY BUTYRIC ACID FROM BACTERIAL CELL**Publication number:** JP55118394**Publication date:** 1980-09-11**Inventor:** POORU AASAA HORUMUSU; REONARUDO
FUREDERITSUKU RAITO; BARI ARUDAASON;
PIITAA JIEEMUSU SENIAA**Applicant:** ICI LTD**Classification:****- international:** C12P7/52; C12R1/38; C08G; C12P; C12P7/40; (IPC1-
7): C12P7/52; C12R1/38**- european:****Application number:** JP19800021041 19800221**Priority number(s):** GB19790006076 19790221[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP55118394

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭55-118394

⑫ Int. Cl.³
C 12 P 7/52
C 12 R 1/38

識別記号
厅内整理番号
6760-4B
6760-4B

⑬ 公開 昭和55年(1980)9月11日
発明の数 2
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑭ 菌体からのポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法

⑮ 特 願 昭55-21041

⑯ 出 願 昭55(1980)2月21日

優先権主張 ⑰ 1979年2月21日 ⑯ イギリス
(GB) ⑰ 7906076

⑰ 発明者 ポール・アーサー・ホルムス
イギリス国クリーブランド・ス
トックトン・オン・テイース・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

⑰ 発明者 レオナルド・フレデリック・ラ
イト

イギリス国クリーブランド・ス
トックトン・オン・テイース・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

⑰ 出願人 インペリヤル・ケミカル・イン
ダストリーズ・リミテッド
イギリス国ロンドン市エスダブ
リュー1ピー3 ジエイエフ・ミ
ルバンク・インペリヤル・ケミ
カル・ハウス(番地なし)

⑰ 代理人 弁理士 湯浅恭三 外2名
最終頁に続く

明細書

1. [発明の名称]

菌体からのポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法

2. [特許請求の範囲]

(1) ポリ-3-オキシ酪酸含有菌体の水性懸濁液
から、ポリ-3-オキシ酪酸を抽出するに際して、
微細な滴状にされた形態の該水性懸濁液を、少な
くとも100°Cに加熱した気体流中へ導入して懸
濁液から水を蒸発させ、得られる乾燥菌体を捕集
し、菌体中のポリ-3-オキシ酪酸に対する溶解
である液体の抽出溶媒と接触させることにより乾
燥菌体からポリ-3-オキシ酪酸を抽出し；そして
ポリ-3-オキシ酪酸を溶解して含む抽出溶媒を
菌体残渣から分離する；ことからなる菌体から
のポリ-3-オキシ酪酸の抽出方法。

(2) 乾燥菌体を抽出溶媒と接触させるに先立つて、
ポリ-3-オキシ酪酸を溶解しないが菌体中の
脂質および/または色素が存在する場合にはその
色素を溶解しうる液体と乾燥菌体を接触させる特
許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) ポリ-3-オキシ酪酸を溶解しない該液体
はアセトンまたはメタノールである特許請求の範
囲第2項記載の方法。

(4) 乾燥用の気体は100~500°Cの範囲の温
度に加熱される特許請求の範囲第1~3項のいづ
れかに記載の方法。

(5) 抽出溶媒は部分ハロゲン化炭化水素である特
許請求の範囲第1~4項のいづれかに記載の方法。

(6) 抽出溶媒は1,2-ジクロルエタン、ジクロ
ルメタンまたはクロロホルムである特許請求の範
囲第5項記載の方法。

(7) 乾燥菌体を40°C以上の温度で抽出溶媒と接
触させる特許請求の範囲第1~6項のいづれかに
記載の方法。

(8) 抽出溶媒の重量は菌体乾燥重量の10~100
倍である特許請求の範囲第1~7項のいづれかに
記載の方法。

(9) ポリ-3-オキシ酪酸含有菌体からポリ-3
-オキシ酪酸を抽出するに際して、該菌体を1,2
-ジクロルエタンと接触させ、ポリ-3-オキシ

脂酸含有溶媒相を菌体残渣から分離することからなる菌体からのポリ-3-オキシ脂酸の抽出方法。

(10) 菌体を1,2-ジクロルエタンと接触させるに先立つて、菌体の水性懸濁液を菌体破壊工程に付す特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11) 1,2-ジクロルエタンを菌体の水性懸濁液と接触させる特許請求の範囲第9または10項に記載の方法。

(12) 菌体を10~40°Cの温度で1,2-ジクロルエタンと接触させる特許請求の範囲第10または11項記載の方法。

(13) 1,2-ジクロルエタンとの接触に先立つて、水性懸濁液のpHを、菌体の等電点pH値または菌体を菌体破壊工程に付す場合には破壊菌体の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節する特許請求の範囲第11項記載の方法。

(14) ポリ-3-オキシ脂酸の抽出溶媒からの分離は、ポリ-3-オキシ脂酸を溶解することができないが抽出溶媒と混和性である液体中でポリ-3-オキシ脂酸を沈澱させることにより行う特許請求

(5)

水の範囲第1~14項のいずれかに記載の方法。

3. [発明の詳細を説明]

本発明は抽出方法、特に微生物菌体からのポリ-3-オキシ脂酸(以下、PHBと称することがある)の抽出方法に関する。

1920年代から、多くの微生物がその菌体内にPHB顆粒をエネルギー儲蓄物質として蓄積することは知られている。米国特許第3167172号明細書には、そのようなPHB含有菌体を例えば噴霧乾燥によつて乾燥し、得られた乾燥菌体を成形用組成物として使用することが提案されている。菌体からPHBを抽出し、それをプラスチック物質として使用するといつつかの提案もなされているが、従来開示された方法は経済的に許容されてきていない。

PHBを抽出するには、一般的には菌体をPHB可溶性溶媒と接触させPHBを菌体物質から抽出させることが必要である。若干の細菌、例えばアゾトバクター属の細菌はそのPHBを容易に抽出溶媒に対して放出するが、一方ではその他

(4)

の細菌、例えばシュードモナダセアエ(Pseudomonadaceae)は、より強固な菌体を有し、菌体破壊処理をしてから抽出溶媒と接触する必要がある。

従来提案された抽出法には、水性培地から例えば遠心分離により、菌体を採取して懸濁菌体マスを得る工程が含まれ、これをアセトンと接触させて乾燥および菌体破壊を行う。そのアセトンの除去後に、PHBを適当な溶媒、例えばビリジン(米国特許第3086959号)またはジクロルエタン/エタノール混合物(米国特許第3044942号)で抽出する。かかる方法は、アセトンが乾燥をより菌体破壊効果を有すると共に、脂質および色素を抽出するので有利である。そのような脂質および色素が存在すれば製品の純度が低下することになる。しかし、乾燥および菌体破壊を行うためのアセトンでの懸濁菌体の処理は大規模の場合には経済的でない。

別の方法は米国特許第3275610号明細書に記載されており、この方法では菌体の水中懸濁

液を超音波振動に付して菌体を破壊し、次いで遠心分離し、乾燥してから、クロロホルムのような溶媒で抽出する。そのクロロホルム溶液からのPHBの分離後にそのPHBを脂質抽出除去のために洗浄する。

また米国特許第4101533号明細書には、乾燥菌体から、または培養液から遠心分離により採取した懸濁菌体から直接に、菌体をある種の環式カーボネート溶媒と共に加熱するとともに抽出することも提案されている。

培養により得られた水性菌体懸濁液から直接に(好ましくはある程度の濃縮後)、ある種の溶媒、例えばクロロホルム、ジクロルメタンまたは1,2-ジクロルメタンと接触させることにより(そして必要な場合にはそのような溶媒との接触前に菌体破壊処理を含せ行い)PHBを抽出することも可能である。しかし、溶媒および抽出条件は、菌体中に存在する非PHB物質、特に脂質および色素(存在するならば)の溶媒による過度の溶解を防ぐよう注意をして選択されなければならない。

(5)

(6)

そのような非PHB物質は製品（すなわちPHB）の純度を低下させて精製の問題を引き起こすだけでなく、脂質が同時に抽出されることにより溶媒相と水性相との間で比較的安定なエマルジョンを形成しやすくからそれらの分離を困難にすることがある。そのような直接抽出法では、脂質を抽出する溶媒は脂質と共に、PHB抽出溶媒での接触に先立つて除去されなければならないので別個の脂質抽出処理工程を行わないので一般的であり、またより効率的な脂質溶媒は水と混和性となり易いので、そのような脂質溶媒の除去は実施上の困難を引き起す。

我々は大規模操作に適用できる特に簡単な方法工程によつてPHBを固体から抽出できることを見出した。

本発明によれば、PHB含有固体の水性懸濁液からPHBを抽出する方法であつて、微細な滴状にされた形態の該水性懸濁液を、少なくとも100℃に加熱した気体流中へ導入して懸濁液から水を蒸発させ；得られる乾燥固体を捕集し；固体中の

(a)

PHBに対する溶媒である液体の抽出溶媒と接触させることにより乾燥固体からPHBを抽出し；そしてPHBを溶解して含む抽出溶媒を固体残渣から分離することを特徴とする固体からのPHBの抽出方法が提供される。

我々はかかる乾燥式の方法は固体を充分に弱化させて、何ら別個の固体破壊処理工程を必要とすることなくPHBを抽出可能にすることを見出した。特に強固な組織については、例えばミーリングのような別個の固体破壊処理工程を行なつてから乾燥処理することはPHBの抽出率の増加のためには望ましいけれども、我々は乾燥処理前のそのような別個の固体破壊処理は必ずしも必要ではなく、実際には、ミーリング処理懸濁液の乾燥処理によつて乾燥器中にかかる堆積のような問題を生ずるので、可能ならばそのような処理を行なわないのが最良である。

本発明の方法においては、固体を脂質抽出処理に付してからPHB抽出溶媒と接触させるのが好ましい。従つて乾燥固体をアセトン、メタノール、

(b)

エタノール、ブタノール、ヘキサンまたは石油エーテルのような脂質／色素溶媒で抽出し、次いで溶解された脂質／色素を含む溶媒を固体から分離した後に、固体をPHB抽出溶媒と接触させることができる。脂質／色素抽出は乾燥固体をその溶媒で還流することにより行なうのが好ましい。アセトンおよびメタノールは好ましい脂質抽出溶媒である。脂質／色素抽出溶媒は別のPHB非溶媒例えばジエチルエーテルと混合して用いることもできる。

かかる脂質抽出によつて、固体のある程度の弱化も起こり、かくして次工程のPHB抽出を助長しうることは了解されよう。

本発明方法においては、固体懸濁液を微細な滴状（例えば噴霧または微細蒸気状）で少なくとも100℃の温度の気体流（例えば空気）中へ導入することからなる乾燥処理によつて、固体は水性懸濁液から分離される。好ましくは、懸濁液は、スプレーまたはアトマイザーノズルを介して導入する。かかる乾燥処理は周知であり、例えば噴霧

(c)

乾燥法およびフラッシュ乾燥法がある。

加熱気体導入口温度は100～500℃であつてよいが、好ましくは120～250℃である。

加熱気体流によつて水分が蒸発除去され、この水分は気体流で運び去られて、残つた乾燥固体は捕集され、PHB抽出溶媒による抽出工程へ送られる。

適当なPHB抽出溶媒の例としては、ビリジン、環式カーボネート化合物、および特に部分塩素化炭化水素類（例えばクロロホルム、ジクロルメタンおよび1,2-ジクロルエタン）がある。1,2-ジクロルエタンは通常PHBの溶媒とは考えられず、この理由はPHBが固体から離れた後には1,2-ジクロルエタン中に容易にまたは完全には溶解しないからである。従つて固体残渣から分離されたPHB溶液は单一相であるように見えるが、沈澱後に1,2-ジクロルエタン中にPHBを再溶解させることによつて作つた溶液は（極めて稀薄な場合を除き）、パール様乳白色の外観を呈し、従つて一旦沈澱され、乾燥されたPHBは

1, 2-ジクロルエタン中には容易には再溶解しない。従つて、そのような溶媒が固体からのPHBの抽出に有効であることは驚くべきことである。

1, 2-ジクロルエタンは乾燥固体からPHBを抽出するのに用いるのに適当な溶媒であるばかりでなく、以下に述べるように、1, 2-ジクロルエタンはある条件下では水性固体懸濁液からPHBを直接に抽出するのに用いても抽出されるPHBが同時に抽出される物質で純度低下するようなことはほとんどない。従つて本発明の一態様によれば、PHB含有固体からPHBを抽出する方法であつて、固体を1, 2-ジクロルエタンと接触させ、PHB含有溶媒相を固体残渣から分離することを特徴とするPHB抽出法が提供される。

水性固体懸濁液を抽出溶媒としての1, 2-ジクロルエタンと接触させる（もし強固な細菌を用いる場合にはミーリングまたは他の固体破壊処理後にこれを行なう）直接抽出法においては、抽出溶媒の濃度は40℃以下としてその溶媒による非PHB物質の過度の抽出を防ぐようにすべきであ

(11)

いと粗PHBの抽出効率が低くなり、過大な粘度の溶液が得られることがあり、他方溶媒の量が多いと不経済である。溶媒の量は、抽出溶液が0.5～5倍、好ましくは1～2倍（重量）のPHBを含むような量であるのが好ましい。

抽出のための接触時間は、不経済的に長くならずして適正な抽出が達成されるような妥協によつて決定される。

抽出溶媒との接触前に固体を乾燥させる場合には、PHB含有溶液からの固体残渣の分離は簡単な済過または遠心分離処理によつて行なうことができる。固体を脂質抽出処理に付してからPHB抽出を行なう場合には、固体残渣からのPHB含有溶液の済過は特に容易となり易く、従つて比較的粗いフィルターを用いて行なうことができる。固体の水性懸濁液を1, 2-ジクロルエタンと接触させてPHBを抽出する場合には、固体残渣は水性相（固体残渣は水性相中に懸濁している）から1, 2-ジクロルエタン相（PHBが溶解されている）を分離することにより除去できる。安定

(12)

る。これとは対照的に、前述のように固体を乾燥させてから溶媒と接触させる場合には、抽出は40℃以上の温度で実施するのが好ましい。従つて、溶媒の沸点までの温度（沸点を含む）を使用することができ、大気圧以上の圧力を用いて大気圧における溶媒沸点よりも、高い温度を使用するようできる。

固体を抽出処理前に乾燥する場合（前述のようない理由で好ましくないので）、固体懸濁液を固体破壊処理（例えばミーリング処理）に付してから乾燥する。抽出温度は40℃以下として脂質の過度の抽出を防ぐべきである。従つて、もし、ミーリング処理懸濁液を乾燥し、熱溶媒で抽出するならば、溶媒からのPHBの沈澱の際に、ゼラチン状の粘着性物が形成され易い。しかし脂質抽出処理を行なつてからPHB溶媒と接触させる場合には、PHB溶媒での抽出は40℃以上の温度で行なうことができる。

使用するPHB溶媒重量は固体乾燥重量の10～100倍であるのが好ましい。溶媒の量が少な

(13)

エマルジョンが形成されることがあるので1, 2-ジクロルエタン相を水性相から分離するのが困難となることが時々ある。若干の場合には遠心分離によつてそのような分離は促進されるけれども、大規模操作では遠心分離は必ずしも効果的でなく、好適でないこともある。

我々は、溶媒と水性相との分離は、抽出溶媒1, 2-ジクロルエタンとの接触に先立つて、水性相のpHを固体の等電点のpH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節することによつて促進されることを見出した。以下に述べるように、若干の固体については、固体水性懸濁液と1, 2-ジクロルエタンとの接触に先立つて固体を破壊するのが望ましい。破壊固体の等電点は未破壊固体の等電点と異なることがある。固体が破壊される場合には、pHは破壊固体の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内に調節すべきである。固体破壊に先立つて固体懸濁液に充分なpH調節剤を添加して、破壊の際に破壊固体の等電点pH値のプラス・マイナス0.5の範囲内のpHを得る

(14)

ことでもできるけれども、固体破壊処理後にpHを調節するのが好ましい。

固体の等電点は、固体が固定的な陽または陰電荷を有しないpH値、すなわち固体が電気的に中和しているpH値である。等電点は、種々のpH値での粒子電気泳動を測定して決定することができ、かくして電荷がゼロとなるpHが求められる。

一般にPHB著種性細菌については、その未破壊および破壊固体の両者の等電点はpH 4~5.5の範囲である。しかし培養中の水性培地のpHは一般に6~8の範囲であり、その至適値は使用細菌の種類やその他の培養条件によつて左右される。上述のように水性培地のpHは等電点pHの0.5以内に調節されるべきである。好ましくは等電点の0.25 pH単位内に、特に等電点プラス0.25 pH単位内に調節される。かかるpH調節は、固体を乾燥してからPHB抽出溶媒と接触させる場合には必要でないことは明かであろう。

固体残渣からのPHB含有抽出溶媒の分離後、そのPHB溶液は、所望ならば、さらに済過して

(15)

済過細菌片を除去してもよい。かかる済過は、5 μm以下、好ましくは2 μm以下の孔寸法のフィルター、例えばガラスファイバーフィルターを用いて行なうのが好ましい。

分離したPHB含有溶液は(好ましくは済過後)被覆、フィルムまたは繊維のようなソルベント注型物品の製造のために直接に使用することができ、あるいはさらにそれを処理して、(例えば溶液の蒸発により、またはPHBを溶解しないが溶液とは混和性である液体中へPHB含有溶液を添加して沈澱させることにより)固体PHBを分離することもできる。そのような沈殿用の液体の例としては、石油エーテルおよびメタノール/水混液がある。PHBは、所望により、メタノールまたはアセトンで洗浄することにより精製できる。

PHBの抽出後の固体残渣は、さらに加工して他の用途、例えば食品(飼料)または肥料に用いることができる。

PHB著種性を有するいずれの細菌もPHB含有固体の生産に使用しうる。「アドバンス・イン-

(16)

マイクロバイアル・フィジオロジー」1978, 10, 208~266のシニア等の論文には1972年6月までに発表された細菌が挙げられている。その他の細菌は米国特許第8072588号にリゾビウム突然変異菌、英国特許第1585682号に特にアルカリグネス・ニクトロファス、ペシラス・メガテリウム、ゾオグロエア・ラミグラおよびマイコプラナ・ルブラの突然変異株が記載されている。好ましいものの中でも、アゾトバクター属(特にクロオコキウム種)、アルカリグネス属(特にニクトロファス種)およびシュードモナダセアエ属、特にシュードモナスAM1およびメテロバクテリウム・オルガノフィラム種を挙げることができる。

それらの細菌の中でも好ましいものは、多くの基質例えば炭水化物、エタノール、メタノール、多価アルコール、二酸化炭素/水素およびカルボン酸のうちの1またはそれ以上を同化することができ、かつ使用基質に応じて好気的または嫌気的に生育しうる細菌である。本発明は、アルコール

特にメタノールの基質で好気培養条件下で生育したシュードモナダセアエ属の固体からのPHB分離に特に有用である。本発明はシューグロースまたはグルコースのような水溶性炭水化物で生育したアゾトバクター属の固体からのPHB分離にも特に有用である。

培養法によつて得られる菌体懸濁液には、典型的には20~55g/lのバイオマスが含まれている。かかる懸濁液が中間の乾燥処理を経て1,2-ジクロルエタンまたは色素/脂質抽出溶媒と接触されるときには、効率的な抽出のためには、その菌体懸濁液は5~15重量%のバイオマス固形分濃度を有するのが好ましい。菌体懸濁液は必要ならば例えば遠心分離によつて濃縮して、上記の濃度範囲とされる。(菌体懸濁液は、培養されたままの状態で既にこの範囲の濃度となつていることがあるけれども、そのような場合でも濃縮するのが好ましいことがある)。

我々は、PHBを1,2-ジクロルエタンによつて水性菌体懸濁液から直接に抽出する場合、

(17)

(18)

PHB は別個の固体破壊処理をする必要なく若干の細胞からは抽出できることを見た。かくして、アゾトバクター萬およびアルカリゲネス属の細胞は 1, 2-ジクロルエタン溶液に対して容易に PHB を放出するので、抽出処理には固体懸濁液と溶液とを攪拌するだけで足りる。この場合の攪拌機は相対運動する摩擦表面を有し、かくして緩和を剪断を与えるようなものが好ましい。シルバーソン (商標: Silverson) ブレンダーは混合するのに使用できる。一層強固な細胞 (例えばシードモナダセアエ属) は固体破壊のための別個の処理を必要とする。この破壊は水性固体懸濁液を、例えばホモジナイザー、ビーズミーリング、ローラーミーリングまたはフレンチプレッシングにより剪断することにより行なうことができる。他の固体破壊方法の例としては、浸透圧ショック、音波もしくは超音波振動、および酵素による固体壁分解がある。次亜塩素酸塩で処理して固体膜を化学的に破壊する方法を用いることができるが、普通それにより PHB が著しく分解されるので好

(19)

ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・バクテリアに寄託された固体の番号である)。上記ペレットを流動床乾燥器中で 40 °C で 10 時間乾燥した。

得られた乾燥固体の 10 g を 500 ml の 1, 2-ジクロルエタン中に室温で 15 分間懸濁させ、次いで落葉相を遠心分離およびデカンテーションによつて取出した。この溶液を 2000 ml のメタノール / 水混液 (容量比メタノール 4: 水 1) に激しく攪拌しながら添加し、粗 PHB を沈殿させた。この沈殿を汎紙上に捕集し、減圧下 50 °C で乾燥した。粗 PHB の収率は 0.5 % 未満であつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を 1, 2-ジクロルエタンと共にシルバーソン (Silverson) ミキサー中で室温で 15 分間剪断した。粗 PHB の収率は 1.4 % であつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を 1, 2-ジクロルエタンにより 88 °C で 15 分間浸流処理した。粗 PHB (純度 94.5 %) の収率は 2.9 % であつた。

(21)

ましくない。意外にも、我々は固体懸濁液を噴霧乾燥またはフラッシュ乾燥すると固体が充分に弱化され、別の固体破壊処理をしなくても PHB の抽出ができるを見た。従つて水性固体懸濁液を噴霧またはフラッシュ乾燥してから抽出溶液 (PHB 用) と接触させる場合には、特別の固体破壊処理は必要ではない。

本発明を以下の例によつて説明する (% は重量 % である)。

例 1 (比較)

この例は、単純な空気乾燥では効率的な PHB 抽出を可能とするような充分な固体の弱化は達成されないことを示すものである。

メチオバクテリウム・オルガノフィラム (NCIB 11482; この詳細は我々の英國特許出願第 7906078 号) の水性懸濁液 1000 ml (60 g のバイオマス固体分を含み、そのうちの 86 % が PHB) を遠心分離して浸潤固体ペレットを得た。(NCIB番号は、スコットランド・アバディーンのトーリイ・リサーチ・ステーションの

(20)

収率は下記式で計算した。

$$\frac{\text{回収粗PHB重量}}{\text{使用固体乾燥重量}} \times \frac{100}{\text{固体中のPHB\%}} \times 100$$

例 2

例 1 で用いた固体の水性懸濁液 500 ml を噴霧乾燥した。この際の懸濁液供給速度は 5000 ml / 時、空気入口温度は 150 °C、空気出口温度は 80 °C であり、そして空気流量は 800 ml / 時であつた。

噴霧乾燥固体 20 g を 1, 2-ジクロルエタン 1000 ml 中に室温で 15 分間懸濁させた。固体破片をウォットマン (Whatman) 541 汎紙で除去した。得られた溶液を 500 ml のメタノール / 水 (4: 1 容) 混合液に激しく攪拌しつつ添加して PHB を沈殿回収した。沈殿を汎紙で捕集した。粗 PHB の収率は 5.7 % であつた。

上記の実験を繰返したが、乾燥固体を 1, 2-ジクロルエタンと共にシルバーソン・ミキサー中で室温で 15 分間剪断した。粗 PHB (純度 98.2 %) の収率は 12.2 % であつた。

(22)

上記の実験を繰返したが、乾燥菌体を1,2-ジクロルエタンによつて88℃で15分間還流処理した。粗PHB(純度98.6%)の収率は98.8%であつた。沈澱をメタノール500mlで5回洗浄し、106℃で乾燥した。洗浄PHBの純度は98.7%であつた。

例 8

例2で用いた噴霧乾燥菌体の20gを600mlのアセトンで56℃において5分間還流して、脂質および色素を抽出し、沪過にエタノールを除去した。残留菌体を1000mlの1,2-ジクロルエタンと共にシルバーソンミキサー中で還流で15分間剪断した。得られた培液をオントマン541沪紙で菌体残渣から分離した。溶液に500mlのメタノール/水(4:1)混合液を激しく攪拌しつつ添加することによりPHBを沈澱させ、その沈澱を沪紙で捕集した。粗PHB(純度96.7%)の収率は48.2%であつた。

上記の実験を繰返したが、アセトン抽出菌体を1,2-ジクロルエタンと共に剪断する代りにそ

(23)

ル、そしてPHB抽出溶媒として1,2-ジクロルエタンの代りにジクルメタンを用いて例4を繰返した。PHB(純度98%)の収率は95%以上であつた。

PHB抽出溶媒としてクロロホルムを用いても同様な結果が得られた。

例 9

アゾトバクター・クロオコキュウ(*Chromobacter*)の培養株を、炭素過剰、酸素制限および基本培養度の条件下に水性培地中でグルコースの阻害により製造した。菌体懸濁液は20g/ℓのバイオマス圆形分を含み、その圆形分のPHB含量は40%であつた。次いで懸濁液を遠心分離により濃縮し80g/ℓのバイオマス圆形分の菌体クリームとした。

菌体クリーム500mlを20℃の1,2-ジクロルエタン1000mlに加え、シルバーソン・ブレンダー・モデルL2Rにより10分間混合した。攪拌エネルギーにより温度が40℃に上昇した。得られたエマルジョンを冷却し、15℃で18000

のアセトン抽出菌体を1,2-ジクロルエタンで88℃において15分間還流処理した。粗PHB(純度98.4%)の収率は95%であつた。

従つて、アセトン抽出処理は冷1,2-ジクロルエタンにより一層多くのPHBの抽出を可能にするよう噴霧乾燥菌体を弱化させるけれども、噴霧乾燥処理单独でも沸騰1,2-ジクロルエタンによりPHBの抽出が可能となる程度に菌体を弱化させることが判る。しかしアセトン抽出処理は抽出されるPHBの純度を向上させる。

例 10

アゾトバクター・クロオコキュウ(*Chromobacter*)(*NCIB 9128*)の水性懸濁液(60g/ℓ)のバイオマス圆形分を含み、その87.8%がPHB)を噴霧乾燥し、アセトン抽出し、還流下で1,2-ジクロルエタンで抽出し、そして沈澱させた(例8と同じ条件)。粗PHB(純度98%)の収率は89.4%であつた。

例 11

脂質抽出溶媒としてアセトンの代りにメタノ

(24)

Gで15分間遠心分離した。水性溶液および菌体破片よりなる上方層をデカンテーションで除いた。PHBを溶解して含む1,2-ジクロルエタンよりなる下方層を500mlのエタノール/水(4:1容)混合液中へ激しく攪拌しながら徐々に注ぎ込んだ。

かくして得られた沈澱PHB(純度97.5%)を沪紙で捕集し、メタノール1000mlで5回洗浄し、減圧下に50℃で乾燥した。これを化学分析したところ下記の組成(%)を有した。

C 55.8, H 7.0, O 37.0,

N <0.2 (理論値:C 55.9, H 6.9, O 37.2)。この値は99.5%

以上の純度に相当する。固体PHBは機械状の風合であつた。収量は14.7g(収率92%)であつた。

比較のために抽出溶媒としてクロロホルムを用いて上記の操作を繰返したとき、収量は16.6gであつたが、純度(メタノール洗浄前)はわずかに88.6%であつた。

(25)

(26)

特許55-118394 (B)

ルエタンのわずかに75%がエマルジョンから分離されたにすぎなかつたこと)によるものである。もしすべての1,2-ジクロルエタンが分離されていたとすれば、計算によるPHB収率は約85%であつた。

例 9

例6を繰返したが、この場合は固体クリーム(pH7、培養後数週間貯蔵)と1,2-ジクロルエタンをシルバーソンブレンダー中で混合した後に、エマルジョンを冷却し遠心分離で分離する代りに自然重力下で30分間静置した。この時間中にエマルジョンは固体破片を含む上方層と、PHB含有1,2-ジクロルエタン溶液の下方層とに分離した。回収した下方層の容量はわずかに170mlであつた。1時間放置した後でも、分離下方層の容量はわずかに420mlであつた。この系(pH7)で迅速な分離を達成するには、エマルジョンを冷却し、15°Cで15分間遠心分離する必要があつた。

例 10

(28)

水性培地中でメタノール酵母により作り、20g/ℓの全バイオマス固体分(そのうち28%がPHB)を含むシードモナスAM1(NCIB 9188)の菌体の水性懸濁液を、例6の方法により1,2-ジクロルエタンと接触させて抽出したが、この場合には分離して120g/ℓのバイオマス固体分を含む菌体クリームとした後に、菌体をダイノミル(Dynomill)で破砕した。この時の処理速度は1.5ℓ/時であり、入口温度20°C、出口温度40°Cであつた。

得られたPHBの純度(メタノール洗浄前)は98.2%、収率は77%であつた。

例 8

例1で用いた菌体の水性懸濁液を遠心分離で120g/ℓのバイオマス固体分を含む菌体クリームとしたものを用いて例7を繰返した。粗PHB(純度98.2%)の収率は68.8%であつた。この収率の水準は、分離した下方層がわずかに750mlの容量であつたこと(すなわち1,2-ジクロ

(27)

例9を繰返したが菌体クリームのpHを種々の値に調節してから、そのクリーム状エマルジョンを1,2-ジクロルエタンと接触させた。30分および60分間静置したときに分離する1,2-ジクロルエタン溶液の量は下表の通りであつた。

pH	分離した1,2-ジクロルエタンの容量(ml)	
	30分後	60分後
4	0 (安定エマルジョン)	30
4.5	410	-
5	650	770
5.5	640	-
6	290	700
7	170	420
8	60	800
9	50	270
10	30	-

菌体クリームの等電点を測定したところ、pH5であつた。

例 11

(29)

アゾトバクター・クロオコキウム(NCIB 9188)のpH5の等電点を有する新たに培養した菌体クリーム(約40%のPHBを含む)を用いて例9を繰返した。pHを5に調節してから菌体クリームを1,2-ジクロルエタンと接触させた。自然重力下でわずかに10分後に水性層と1,2-ジクロルエタン層とが迅速に分離し、850mlの1,2-ジクロルエタン層が分離し、回収できた。例6のようにしてPHBを沈殿させ、洗浄した。PHB(純度99.5%)の収率は84%であつた。

例 12

pH7.0の水性培地中でメタノールの好気酵母によりシードモナスAM1(NCIB 9188)の菌体水性懸濁液を作つた。この液は20g/ℓの全バイオマス固体分(80%がPHB)を含んでいた。この液を遠心分離で濃縮して80g/ℓのバイオマス固体分の菌体クリームとした。これをダイノミルで破砕して菌体を破壊した。処理速度は1.2ℓ/時であり、入口温度20°C、出口温

(30)

度40°Cであつた。得られた破壊液体の等電点はpH 4.7.5であつた。

破壊液体の懸濁液のpHを4.7.5に調節し、この懸濁液の500mlを1名の1,2-ジクロルエタンに添加した。この混合物をシルバーソン・ブレンダー・モデルL2Rを低混合速度で用いて10分間混合した。得られたエマルジョンを静置した。

10分後に800mlの1,2-ジクロルエタンが分離していた。次いでPHBを例6の方法で1,2-ジクロルエタンから分離した。PHB収率は78%であつた。

pH調節を全く行なわずに上記実験を繰返したとき、破壊液体懸濁液をより1,2-ジクロルエタンの混合の際に、比較的安定なエマルジョンが形成され、このものは遠心分離したときにだけ分離した。

例 18

抽出溶媒としての種々の溶媒の有効性を比較するため、500mlのアゾトバクター・クロオコ

(31)

空気

(32)

溶媒	冷抽出			通常抽出		
	回収率(%)		シロップの固形分含量(%)	シロップの固形分含量(%)		
	80分	60分	全	PHB	全	PHB
1,2-ジクロルエタン	55	75	1.15	0.89	1.82	0.92
クロロホルム	0	0	1.27	0.92	1.85	0.95
ジクロルメタン	12	85	1.51	0.95	1.07	0.69
1,1,1-トリクロルエタン	45	60	0.8	ND	0.85	ND
1,1,2-トリクロルエチレン	45	50	0.12	ND	0.22	ND
1,1,2,2-チトラクロルエタン	85	90	0.01	ND	0.05	ND
ビリジン	0	0	0.01	ND	—	—
1,2-ブロビレンカーボネート	8	15	0.01	ND	ND	ND

ND = 検定

* 静置に際し分離が不良のため、エマルジョンを遠心分離して、全固形分およびPHB含量測

(33)

キウム(NCIB 9125)の液体クリーミー(バイオマス固形分含量50g/l; pH 5.0)を、被試験溶媒1mlを20°Cで注ぎ込んだ。得られた混合物をシルバーソンブレンダー(モデルL2R)で10分間混合し、重力下で分離させた。30分および60分後に分離した溶媒の量を測定した。分離後、溶媒層(ここではシロップと称する)をサイフォンで取出し、その固形分を試料の蒸発乾固により測定した。シロップのPHB含量は例6のような水/メタノール混液中の沈殿により測定した。

シルバーソン・ブレンダーでの混合の代りに通常条件下で15分間成形することにより上記の操作を繰返した。結果を下表に示す。

定のためのサンプルを得た。

種々の溶媒中におけるPHBの溶解特性を調べるため、冷抽出で得られた沈殿PHBのクロロホルム、ジクロルメタンおよび1,2-ジクロルエタンによる再溶解を、各別量の冷溶媒と乾燥後の沈殿PHBとを混合することにより試みた。沈殿PHBは冷クロロホルムまたは冷ジクロルメタンに再溶解したが、冷1,2-ジクロルエタンには溶解性でなかつた。

特許出願人 インペリカル・ケミカル・インダストリーズ・リミテッド

代理人弁理士 湯浅恭三 (外2名)

(34)

第1頁の続き

優先権主張 ②1979年2月21日③イギリス
(G B)④7906077

②1979年5月8日③イギリス
(G B)④7915858

②発明者 バリー・アルダーソン
イギリス国クリーブランド・ス
トツクトン・オン・テイース・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)

②発明者 ピーター・ジェームス・セニア

イギリス国クリーブランド・ス
トツクトン・オン・テイース・
ノートン・ザ・グリーン・ノー
トン・ホール(番地なし)